

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

PCT/JP03/00883

29 JUL 2004  
30.01.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日

Date of Application:

2002年 1月30日

REC'D 28 MAR 2003

WIPO

PCT

出願番号

Application Number:

特願2002-021159

[ST.10/C]:

[JP2002-021159]

出願人

Applicant(s):

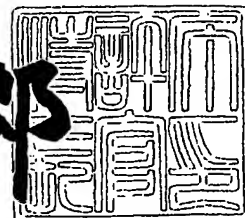
理化学研究所

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 3月11日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3014823

BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願

【整理番号】 A21046A

【提出日】 平成14年 1月30日

【あて先】 特許庁長官 殿

【発明者】

    【住所又は居所】 埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所内

    【氏名】 高島 晶

【発明者】

    【住所又は居所】 埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所内

    【氏名】 辻本 雅文

【発明者】

    【住所又は居所】 神奈川県秦野市室町2-26

    【氏名】 辻 崇一

【特許出願人】

    【識別番号】 000006792

    【氏名又は名称】 理化学研究所

【代理人】

    【識別番号】 100092635

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 塩澤 寿夫

【選任した代理人】

    【識別番号】 100096219

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 今村 正純

【選任した代理人】

    【識別番号】 100095843

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 釜田 淳爾

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 007663

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9607613

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 糖鎖合成酵素

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 以下の基質特異性および基質選択性を有することを特徴とする、O-glycan  $\alpha$ 2,8-シアル酸転移酵素。

基質特異性：末端にSia $\alpha$ 2,3(6)Gal（ここで、Siaはシアル酸を示し、Galはガラクトースを示す）構造をもつ糖を基質とする；

基質選択性：糖脂質およびN型糖鎖よりも優先的にO型糖鎖に対してシアル酸を取り込ませる；

【請求項 2】 下記の何れかのアミノ酸配列を有するO-glycan  $\alpha$ 2,8-シアル酸転移酵素。

(1) 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列；又は

(2) 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、O-glycan  $\alpha$ 2,8-シアル酸転移を触媒する活性を有するアミノ酸配列；

【請求項 3】 請求項 2 に記載のO-glycan  $\alpha$ 2,8-シアル酸転移酵素のアミノ酸配列をコードするO-glycan  $\alpha$ 2,8-シアル酸転移酵素遺伝子。

【請求項 4】 下記の何れかの塩基配列を有する請求項 3 に記載のO-glycan  $\alpha$ 2,8-シアル酸転移酵素。

(1) 配列表の配列番号 2 に記載の塩基配列中の塩基番号 77 番目から 1270 番目で特定される塩基配列；又は

(2) 配列表の配列番号 2 に記載の塩基配列中の塩基番号 77 番目から 1270 番目で特定される塩基配列において 1 から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、O-glycan  $\alpha$ 2,8-シアル酸転移を触媒する活性を有する蛋白質をコードする塩基配列；

【請求項 5】 請求項 3 または 4 に記載のO-glycan  $\alpha$ 2,8-シアル酸転移酵素遺伝子を含む組み換えベクター。

【請求項 6】 発現ベクターである、請求項 5 に記載の組み換えベクター。

【請求項 7】 請求項 5 または 6 に記載の組み換えベクターにより形質転換

された形質転換体。

【請求項 8】 請求項 7 に記載の形質転換体を培養し培養物から請求項 1 または 2 に記載の酵素を採取することを特徴とする、請求項 1 または 2 に記載の酵素の製造方法。

【請求項 9】 下記の何れかのアミノ酸配列を有する O-glycan  $\alpha$ 2,8-シアル酸転移酵素活性ドメインから成る蛋白質。

(1) 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸番号 26～398 から成るアミノ酸配列；又は

(2) 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸番号 26～398 から成るアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、O-glycan  $\alpha$ 2,8-シアル酸転移を触媒する活性を有するアミノ酸配列：

【請求項 10】 請求項 1 または 2 に記載の O-glycan  $\alpha$ 2,8-シアル酸転移酵素の活性ドメインであるポリペプチド部分とシグナルペプチドとを含む細胞外分泌型の蛋白であって、O-glycan  $\alpha$ 2,8-シアル酸転移を触媒する活性を有する蛋白質。

【請求項 11】 請求項 9 又は 10 に記載の蛋白質をコードする遺伝子。

【請求項 12】 請求項 11 に記載の遺伝子を含む組み換えベクター。

【請求項 13】 発現ベクターである、請求項 12 に記載の組み換えベクター。

【請求項 14】 請求項 12 または 13 に記載の組み換えベクターにより形質転換された形質転換体。

【請求項 15】 請求項 14 に記載の形質転換体を培養し培養物から請求項 9 または 10 に記載の蛋白質を採取することを特徴とする、請求項 9 または 10 に記載の蛋白質の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

本発明は糖鎖合成酵素および該酵素をコードする DNA に関するものである。

さらに詳しくは、本発明はムチンなどのO型糖鎖のうち、末端にSia $\alpha$ 2,3(6)Gal (Sia: シアル酸、Gal: ガラクトース)構造をもつ糖鎖のシアル酸部分に $\alpha$ 2,8の結合様式でシアル酸を効率良く転移する酵素(O-glycan  $\alpha$ 2,8-シアル酸転移酵素、ST8Sia VI)および該酵素をコードするDNAに関するものである。本発明のO-glycan  $\alpha$ 2,8-シアル酸転移酵素は、癌転移抑制、ウイルス感染抑防止、炎症反応抑制、神経細胞賦活効果を有する薬剤として、あるいは糖鎖にシアル酸を付加することにより生理作用を増加させるための試薬、その他、酵素阻害剤等として有用である。

【0002】

【従来技術】

シアル酸は、たとえば細胞-細胞間伝達、細胞基質相互作用、細胞接着などの重要な生理作用を司る物質である。発生、分化の過程に特異的な、あるいは臓器特異的なシアル酸含有糖鎖の存在が知られている。シアル酸は糖タンパク質および糖脂質の糖鎖部分の末端位置に存在しており、これらの部位へのシアル酸の導入は、酵素的にCMP-Siaからの転移によってなされる。

【0003】

このシアル酸の酵素的導入(シアル酸転移)を担う酵素は、シアル酸転移酵素(sialyltransferase)と呼ばれるグリコシルトランスフェラーゼ類である。ほ乳類では現在までに18種類のシアル酸転移酵素の存在が知られているが、これらはシアル酸の転移様式から4つのファミリーに大別される(Tsuiji, S. (1996) J. Biochem. 120, 1-13)。すなわち、 $\alpha$ 2,3の結合様式でガラクトースにシアル酸を転移する $\alpha$ 2,3-シアル酸転移酵素(ST3Gal-ファミリー)、 $\alpha$ 2,6の結合様式でガラクトースにシアル酸を転移する $\alpha$ 2,6-シアル酸転移酵素(ST6Gal-ファミリー)、 $\alpha$ 2,6の結合様式でN-アセチルガラクトサミンにシアル酸を転移するGalNAc  $\alpha$ 2,6-シアル酸転移酵素(ST6GalNAc-ファミリー)、および $\alpha$ 2,8の結合様式でシアル酸にシアル酸を転移する $\alpha$ 2,8-シアル酸転移酵素(ST8Sia-ファミリー)である。

【0004】

このうち $\alpha$ 2,8-シアル酸転移酵素については現在までに5種類の酵素(ST8Sia I-V)についてcDNAクローニングが行われており、その酵素学的諸性質も明らかに

なっている(Yamamoto, A. et al. (1996) J. Neurochem. 66, 26-34; Kojima, N. et al. (1995) FEBS Lett. 360, 1-4; Yoshida, Y. et al. (1995) J. Biol. Chem. 270, 14628-14633; Yoshida, Y. et al. (1995) J. Biochem. 118, 658-664; Kono, M. et al. (1996) J. Biol. Chem. 271, 29366-29371)。ST8Sia IはガングリオシドのGD3合成酵素であり、ST8Sia Vは同じくガングリオシドのGD1c, GT1a, GQ1b, GT3などを合成する酵素である。ST8Sia II, IVは神経細胞接着分子(NCAM)のN型糖鎖上にポリシアル酸を合成する酵素である。ST8Sia IIIは糖タンパク質のN型糖鎖および糖脂質に見いだされるSia $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,4GlcNAc (GlcNAc: N-アセチルグルコサミン)構造にシアル酸を転移する酵素である。これらの酵素はいずれも糖脂質あるいはN型糖鎖を好ましい基質としており、O型糖鎖に対する活性は、NCAMの一つのアイソフォームに見いだされるO型糖鎖上にST8Sia II, IVがオリゴシアル酸/ポリシアル酸を合成する例と、脂肪細胞特異的糖タンパク質AdipoQのO型糖鎖にST8SiaIIIが作用する例が報告されているだけである(Suzuki, M. et al. (2000) Glycobiology 10, 1113; 及びSato C, et al. (2001) J. Biol. Chem. 276, 28849-28856)。すなわち今までに報告されてきている $\alpha$ 2,8-シアル酸転移酵素は、通常O型糖鎖を好ましい基質としてはおらず、これを好ましい基質とする $\alpha$ 2,8-シアル酸転移酵素の存在は知られていなかった。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

上記した通り、今までに知られている $\alpha$ 2,8-シアル酸転移酵素は5種類存在するが、これらはいずれもN型糖鎖をもつ糖タンパク質またはガングリオシドなどの糖脂質を主な基質とし、O型糖鎖をもつ糖タンパク質に対しては活性を全く示さないか、限定的な活性を示すだけであった。本発明は、この問題を解決し、O型糖鎖に対し高い活性を示す新規なO-glycan  $\alpha$ 2,8-シアル酸転移酵素を提供することを解決すべき課題とした。また、本発明は、O-glycan  $\alpha$ 2,8-シアル酸転移酵素をコードするcDNAをクローニングし、該O-glycan  $\alpha$ 2,8-シアル酸転移酵素をコードするDNA 配列および該酵素のアミノ酸配列を提供することを解決すべき課題とした。さらに本発明は、上記のO-glycan  $\alpha$ 2,8-シアル酸転移酵素の構造のうち、活性に係わる部分を大量に蛋白として発現させることを解決すべき

課題とした。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、上記の課題を解決すべく鋭意努力し、マウス脳及び心臓の各cDNAライブラリーをスクリーニングし、またマウス腎臓由来cDNAを鋳型としたPCRを行うことにより、O-glycan  $\alpha$ 2,8-シアル酸転移酵素をコードするcDNAをクローニングすることに成功し、本発明を完成するに至った。

即ち、本発明によれば、以下の基質特異性および基質選択性を有することを特徴とする、O-glycan  $\alpha$ 2,8-シアル酸転移酵素が提供される。

基質特異性：末端にSia $\alpha$ 2,3(6)Gal（ここで、Siaはシアル酸を示し、Galはガラクトースを示す）構造をもつ糖を基質とする；

基質選択性：糖脂質およびN型糖鎖よりも優先的にO型糖鎖に対してシアル酸を取り込ませる；

【0007】

好ましくは、本発明により、下記の何れかのアミノ酸配列を有するO-glycan  $\alpha$ 2,8-シアル酸転移酵素が提供される。

(1) 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列；又は

(2) 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、O-glycan  $\alpha$ 2,8-シアル酸転移を触媒する活性を有するアミノ酸配列；

【0008】

本発明の別の側面によれば、上記した本発明のO-glycan  $\alpha$ 2,8-シアル酸転移酵素のアミノ酸配列をコードするO-glycan  $\alpha$ 2,8-シアル酸転移酵素遺伝子が提供される。

【0009】

好ましくは、本発明により、下記の何れかの塩基配列を有するO-glycan  $\alpha$ 2,8-シアル酸転移酵素が提供される。

(1) 配列表の配列番号2に記載の塩基配列中の塩基番号77番目から1270



番目で特定される塩基配列；又は

(2) 配列表の配列番号 2 に記載の塩基配列中の塩基番号 7 7 番目から 1 2 7 0 番目で特定される塩基配列において 1 から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、O-glycan  $\alpha$  2,8-シアル酸転移を触媒する活性を有する蛋白質をコードする塩基配列：

【0 0 1 0】

本発明のさらに別の側面によれば、上記した本発明のO-glycan  $\alpha$  2,8-シアル酸転移酵素遺伝子を含む組み換えベクター（好ましくは、発現ベクター）；上記した組み換えベクターにより形質転換された形質転換体；並びに上記した形質転換体を培養し培養物から本発明の酵素を採取することを特徴とする本発明の酵素の製造方法が提供される。

【0 0 1 1】

本発明のさらに別の側面によれば、下記の何れかのアミノ酸配列を有するO-glycan  $\alpha$  2,8-シアル酸転移酵素活性ドメインから成る蛋白質が提供される。

(1) 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸番号 2 6 ～ 3 9 8 から成るアミノ酸配列；又は

(2) 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸番号 2 6 ～ 3 9 8 から成るアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、O-glycan  $\alpha$  2,8-シアル酸転移を触媒する活性を有するアミノ酸配列：

【0 0 1 2】

本発明のさらに別の側面によれば、本発明のO-glycan  $\alpha$  2,8-シアル酸転移酵素の活性ドメインであるポリペプチド部分とシグナルペプチドとを含む細胞外分泌型の蛋白であって、O-glycan  $\alpha$  2,8-シアル酸転移を触媒する活性を有する蛋白質が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、上記した本発明の細胞外分泌型の蛋白質をコードする遺伝子が提供される。

【0 0 1 3】

本発明のさらに別の側面によれば、上記した本発明の細胞外分泌型の蛋白質を

コードする遺伝子を含む組み換えベクター（好ましくは、発現ベクター）；上記した組み換えベクターにより形質転換された形質転換体；並びに上記した形質転換体を培養し培養物から本発明の酵素を採取することを特徴とする本発明の蛋白質の製造方法が提供される。

【0014】

【発明の実施の形態】

以下、本発明の実施態様及び実施方法について詳細に説明する。

（１）本発明の酵素及び蛋白質

本発明のO-glycan  $\alpha$ 2,8-シアル酸転移酵素は、以下の基質特異性および基質選択性を有することを特徴とする。

基質特異性：末端にSia $\alpha$ 2,3(6)Gal（ここで、Siaはシアル酸を示し、Galはガラクトースを示す）構造をもつ糖を基質とする；

基質選択性：糖脂質およびN型糖鎖よりも優先的にO型糖鎖に対してシアル酸を取り込ませる；

【0015】

上記した基質特異性及び基質選択性は、本明細書に記載した実施例で取得されたマウス由来のO-glycan  $\alpha$ 2,8-シアル酸転移酵素について実証された性質である。本発明のO-glycan  $\alpha$ 2,8-シアル酸転移酵素の由来はマウス由来のものに限定されるものではなく、同型のO-glycan  $\alpha$ 2,8-シアル酸転移酵素が他の哺乳類の組織に存在し、かつ、それらのO-glycan  $\alpha$ 2,8-シアル酸転移酵素が互いに高度の相同性を有していることは当業者に容易に理解される。

【0016】

このようなO-glycan  $\alpha$ 2,8-シアル酸転移酵素は、上記した基質特異性及び基質選択性を有することを特徴とするものであり、すべて本発明の範囲に属するものである。

このような酵素としては、哺乳類組織由来の天然型酵素やその変異体、または以下の実施例で作製したようなO-glycan  $\alpha$ 2,8-シアル酸転移を触媒し、遺伝子組み換え技術により製造された細胞外分泌型蛋白質などを挙げることができるが、これらはいずれも本発明の範囲に包含されるものである。

## 【0017】

本発明のO-glycan  $\alpha$ 2,8-シアル酸転移酵素の一例としては、下記の何れかのアミノ酸配列を有するO-glycan  $\alpha$ 2,8-シアル酸転移酵素が挙げられる。

- (1) 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列；又は
- (2) 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、O-glycan  $\alpha$ 2,8-シアル酸転移を触媒する活性を有するアミノ酸配列：

## 【0018】

さらに、本発明のO-glycan  $\alpha$ 2,8-シアル酸転移酵素の活性ドメイン、あるいはそのアミノ酸配列の一部を改変又は修飾して得られるO-glycan  $\alpha$ 2,8-シアル酸転移酵素活性を有する蛋白質は全て本発明の範囲に包含されることを理解すべきである。このような活性ドメインの好ましい例としては、配列表の配列番号1に記載したアミノ酸配列の26～398により特定されるO-glycan  $\alpha$ 2,8-シアル酸転移酵素の活性ドメインを挙げることができる。また、配列表の配列番号1に記載したアミノ酸配列の26～100前後までの配列はステムと呼ばれる領域なので活性には必ずしも必須ではないと考えられる。従って、配列表の配列番号1に記載したアミノ酸配列の101～398の領域をO-glycan  $\alpha$ 2,8-シアル酸転移酵素の活性ドメインとして使用してもよい。

## 【0019】

即ち、本発明によれば、下記の何れかのアミノ酸配列を有するO-glycan  $\alpha$ 2,8-シアル酸転移酵素活性ドメインから成る蛋白質が提供される。

- (1) 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列のアミノ酸番号26～398から成るアミノ酸配列；又は
- (2) 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列のアミノ酸番号26～398から成るアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、O-glycan  $\alpha$ 2,8-シアル酸転移を触媒する活性を有するアミノ酸配列：

## 【0020】

本明細書で言う「1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有する

「アミノ酸配列」における「1から数個」の範囲は特には限定されないが、例えば、1から20個、好ましくは1から10個、より好ましくは1から7個、さらに好ましくは1から5個、特に好ましくは1から3個程度を意味する。

#### 【0021】

本発明の酵素又は蛋白質の取得方法については特に制限はなく、化学合成により合成した蛋白質でもよいし、遺伝子組み換え技術により作製した組み換え蛋白質でもよい。

組み換え蛋白質を作製する場合には、先ず当該蛋白質をコードするDNAを入手することが必要である。本明細書の配列表の配列番号1に記載したアミノ酸配列、及び配列番号2に記載した塩基配列の情報を利用することにより適当なプライマーを設計し、それらを用いて適当なcDNAライブラリーを鋳型にしてPCRを行うことにより、本発明の酵素をコードするDNAを取得することができる。

例えば、配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するO-glycan  $\alpha$ 2,8-シアル酸転移酵素をコードするcDNAの単離する方法は以下の実施例に詳細に説明されている。もっとも、本発明のO-glycan  $\alpha$ 2,8-シアル酸転移酵素をコードするcDNAの単離方法はこれらの方法に限定されることはなく、当業者は下記の実施例に記載された方法を参照しつつ、この方法を適宜修飾ないし変更することにより、容易に目的のcDNAを単離することができる。

#### 【0022】

また、本発明の酵素をコードするDNAの一部の断片を上記したPCRにより得た場合には、作製したDNA断片を順番に遺伝子組み換え技術により連結することにより、所望の酵素をコードするDNAを得ることができる。このDNAを適当な発現系に導入することにより、本発明の酵素を産生することができる。発現系での発現については本明細書中後記する。

#### 【0023】

さらに、本発明のO-glycan  $\alpha$ 2,8-シアル酸転移酵素の活性ドメインであるポリペプチド部分とシグナルペプチドとを含む細胞外分泌型の蛋白であって、O-glycan  $\alpha$ 2,8-シアル酸転移を触媒する活性を有する蛋白質も本発明に含まれる。

## 【 0 0 2 4 】

本発明の O-glycan  $\alpha$  2,8-シアル酸転移酵素は、発現後に細胞内に留まり、細胞外に分泌されない場合がある。また、細胞内濃度が一定以上になると、酵素の発現量が低下するという可能性がある。上記の O-glycan  $\alpha$  2,8-シアル酸転移酵素の O-glycan  $\alpha$  2,8-シアル酸転移活性を有効に利用するために、本酵素の活性を維持し、かつ発現時に細胞から分泌される可溶性形態の蛋白を製造することができる。このような蛋白としては、本発明の O-glycan  $\alpha$  2,8-シアル酸転移酵素の活性に参与する O-glycan  $\alpha$  2,8-シアル酸転移酵素の活性ドメインであるポリペプチド部分とシグナルペプチドとを含む細胞外分泌型の蛋白であって、O-glycan  $\alpha$  2,8-シアル酸転移を触媒する蛋白質を挙げることができる。例えば、本明細書に記載されたプロテイン A との融合蛋白は本発明の分泌型蛋白の好ましい態様である。

## 【 0 0 2 5 】

これまでにクローニングされたシアル酸転移酵素は、他のグリコシルトランスフェラーゼと同様のドメイン構造を有している。すなわち、NH<sub>2</sub> 末端の短い細胞質中尾部、疎水性のシグナルアンカードメイン、蛋白分解感受性を有するステム(stem)領域、及び COOH-末端の大きな活性ドメインを有する (Paulson, J.C. and Colley, K.J., J. Biol. Chem., 264, 17615-17618, 1989)。本発明の O-glycan  $\alpha$  2,8-シアル酸転移酵素の経膜ドメインの位置を調べるためには、カイト及びドゥーリトル (Kyte, J. and Doolittle, R.F., J. Mol. Biol., 157, 105-132, 1982) の方法に従って作成した疎水性分布図を利用することができる。また、活性ドメイン部分の推定には、各種のフラグメントを導入した組換えプラスミドを作成して利用することができる。このような方法の一例は、例えば PCT/JP94/02182 号の明細書に詳細に記載されているが、経膜ドメインの位置の確認や活性ドメイン部分の推定方法は、この方法に限定されることはない。

## 【 0 0 2 6 】

O-glycan  $\alpha$  2,8-シアル酸転移酵素の活性ドメインであるポリペプチド部分とシグナルペプチドとを含む細胞外分泌型の蛋白の製造のためには、例えばシグナルペプチドとして免疫グロブリンシグナルペプチド配列を用い、O-glycan  $\alpha$  2,

8-シアル酸転移酵素の活性ドメインに対応する配列を該シグナルペプチドにインフレーム融合させればよい。このような方法としては、例えば、ジョブリンの方法(Jobling, S.A. and Gehrke, L., Nature(Lond.), 325, 622-625, 1987)を利用することができる。また、本明細書の実施例に詳細に説明されているように、プロテインAとの融合蛋白を製造してもよい。もっとも、シグナルペプチドの種類やシグナルペプチドと活性ドメインの結合方法、または可溶化の方法は上記方法に限定されることはなく、当業者は、O-glycan  $\alpha$ 2,8-シアル酸転移酵素の活性ドメインであるポリペプチド部分を適宜選択することができるし、それらを利用可能な任意のシグナルペプチドと適宜の方法により結合することにより細胞外分泌型の蛋白を製造することができる。

【0027】

## (2) 本発明の遺伝子

本発明によれば、本発明のO-glycan  $\alpha$ 2,8-シアル酸転移酵素のアミノ酸配列をコードする遺伝子が提供される。

本発明のO-glycan  $\alpha$ 2,8-シアル酸転移酵素のアミノ酸配列をコードする遺伝子の具体例としては、下記の何れかの塩基配列を有する遺伝子が挙げられる。

(1) 配列表の配列番号2に記載の塩基配列中の塩基番号77番目から1270番目で特定される塩基配列；又は

(2) 配列表の配列番号2に記載の塩基配列中の塩基番号77番目から1270番目で特定される塩基配列において1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、O-glycan  $\alpha$ 2,8-シアル酸転移を触媒する活性を有する蛋白質をコードする塩基配列；

【0028】

本明細書で言う「1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列」における「1から数個」の範囲は特には限定されないが、例えば、1から60個、好ましくは1から30個、より好ましくは1から20個、さらに好ましくは1から10個、さらに好ましくは1から5個、特に好ましくは1から3個程度を意味する。

【0029】

さらに、本発明のO-glycan  $\alpha$ 2,8-シアル酸転移酵素の活性ドメインから成る蛋白質、並びに該活性ドメインであるポリペプチド部分とシグナルペプチドとを含む細胞外分泌型の蛋白であって、O-glycan  $\alpha$ 2,8-シアル酸転移を触媒する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子も本発明の範囲に属する。

【0030】

本発明の遺伝子の取得方法は上述した通りである。

また、所定の核酸配列に所望の変異を導入する方法は当業者に公知である。例えば、部位特異的変異誘発法、縮重オリゴヌクレオチドを用いるPCR、核酸を含む細胞の変異誘発剤又は放射線への露出等の公知の技術を適宜使用することによって、変異を有するDNAを構築することができる。このような公知の技術は、例えば、Molecular Cloning: A laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY., 1989、並びにCurrent Protocols in Molecular Biology, Supplement 1~38, John Wiley & Sons (1987-1997)に記載されている。

【0031】

### (3) 本発明の組み換えベクター

本発明の遺伝子は適当なベクター中に挿入して使用することができる。本発明で用いるベクターの種類は特に限定されず、例えば、自立的に複製するベクター（例えばプラスミド等）でもよいし、あるいは、宿主細胞に導入された際に宿主細胞のゲノムに組み込まれ、組み込まれた染色体と共に複製されるものであってもよい。

好ましくは、本発明で用いるベクターは発現ベクターである。発現ベクターにおいて本発明の遺伝子は、転写に必要な要素（例えば、プロモーター等）が機能的に連結されている。プロモーターは宿主細胞において転写活性を示すDNA配列であり、宿主の種類に応じて適宜選択することができる。

【0032】

細菌細胞で作動可能なプロモーターとしては、バチルス・ステアロテルモフィルス・マルトジェニック・アミラーゼ遺伝子(Bacillus stearothermophilus maltogenic amylase gene)、バチルス・リケニホルミス $\alpha$ アミラーゼ遺伝子(Bacillus

licheniformis alpha-amylase gene)、バチルス・アミロリケファチエンス・BANアミラーゼ遺伝子(Bacillus amyloliquefaciens BAN amylase gene)、バチルス・サブチリス・アルカリプロテアーゼ遺伝子(Bacillus Subtilis alkaline protease gene)もしくはバチルス・プミルス・キシロシダーゼ遺伝子(Bacillus pumilus xylosidase gene)のプロモータ、またはファージ・ラムダの $P_R$ 若しくは $P_L$ プロモータ、大腸菌の lac、trp若しくはtacプロモータなどが挙げられる。

#### 【0033】

哺乳動物細胞で作動可能なプロモータの例としては、SV40プロモータ、MT-1 (メタロチオネイン遺伝子)プロモータ、またはアデノウイルス2主後期プロモータなどがある。昆虫細胞で作動可能なプロモータの例としては、ポリヘドリンプロモータ、P10プロモータ、オートグラフィア・カリホルニカ・ポリヘドロシス塩基性タンパクプロモータ、バキュウロウイルス即時型初期遺伝子1プロモータ、またはバキュウロウイルス39K遅延型初期遺伝子プロモータ等がある。酵母宿主細胞で作動可能なプロモータの例としては、酵母解糖系遺伝子由来のプロモータ、アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子プロモータ、TP11プロモータ、ADH2-4cプロモータなどが挙げられる。

糸状菌細胞で作動可能なプロモータの例としては、ADH3プロモータまたはtpiAプロモータなどがある。

#### 【0034】

また、本発明のDNAは必要に応じて、例えばヒト成長ホルモントーミネータまたは真菌宿主についてはTP11ターミネータ若しくはADH3ターミネータのような適切なターミネータに機能的に結合されてもよい。本発明の組み換えベクターは更に、ポリアデニレーションシグナル(例えばSV40またはアデノウイルス5E1b領域由来のもの)、転写エンハンサ配列(例えばSV40エンハンサ)および翻訳エンハンサ配列(例えばアデノウイルスVA RNAをコードするもの)のような要素を有していてもよい。

本発明の組み換えベクターは更に、該ベクターが宿主細胞内で複製することを可能にするDNA配列を具備してもよく、その一例としてはSV40複製起点(宿主細胞が哺乳類細胞のとき)が挙げられる。



## 【0035】

本発明の組み換えベクターはさらに選択マーカ含有してもよい。選択マーカとしては、例えば、ジヒドロ葉酸レダクターゼ（DHFR）またはシゾサッカロマイセス・ポンベTPI遺伝子等のようなその補体が宿主細胞に欠けている遺伝子、または例えばアンピシリン、カナマイシン、テトラサイクリン、クロラムフェニコール、ネオマイシン若しくはヒグロマイシンのような薬剤耐性遺伝子を挙げることができる。

本発明のDNA、プロモータ、および所望によりターミネータおよび／または分泌シグナル配列をそれぞれ連結し、これらを適切なベクターに挿入する方法は当業者に周知である。

## 【0036】

（4）本発明の形質転換体及びそれを用いた蛋白質の製造

本発明のDNA又は組み換えベクターを適当な宿主に導入することによって形質転換体を作製することができる。

本発明のDNAまたは組み換えベクターを導入される宿主細胞は、本発明のDNA構築物を発現できれば任意の細胞でよく、細菌、酵母、真菌および高等真核細胞等が挙げられる。

## 【0037】

細菌細胞の例としては、バチルスまたはストレプトマイセス等のグラム陽性菌又は大腸菌等のグラム陰性菌が挙げられる。これら細菌の形質転換は、プロトプラスト法、または公知の方法でコンピテント細胞を用いることにより行えばよい。

哺乳類細胞の例としては、HEK293細胞、HeLa細胞、COS細胞、BHK細胞、CHL細胞またはCHO細胞等が挙げられる。哺乳類細胞を形質転換し、該細胞に導入されたDNA配列を発現させる方法も公知であり、例えば、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等を用いることができる。

## 【0038】

酵母細胞の例としては、サッカロマイセスまたはシゾサッカロマイセスに属す

る細胞が挙げられ、例えば、サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) またはサッカロマイセス・クルイベリ (*Saccharomyces kluyveri*) 等が挙げられる。酵母宿主への組み換えベクターの導入方法としては、例えば、エレクトロポレーション法、スフェロブラスト法、酢酸リチウム法等を挙げることができる。

#### 【0039】

他の真菌細胞の例は、糸状菌、例えばアスペルギルス、ニューロスボラ、フザリウム、またはトリコデルマに属する細胞である。宿主細胞として糸状菌を用いる場合、DNA構築物を宿主染色体に組み込んで組換え宿主細胞を得ることにより形質転換を行うことができる。DNA構築物の宿主染色体への組み込みは、公知の方法に従い、例えば相同組換えまたは異種組換えにより行うことができる。

#### 【0040】

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、蛋白質を発現させることができる (例えば、*Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual*; 及びカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、*Bio/Technology*, 6, 47(1988)等に記載)。

#### 【0041】

バキュロウイルスとしては、例えば、ヨトウガ科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフィ・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス (*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*) 等を用いることができる。

昆虫細胞としては、*Spodoptera frugiperda* の卵巣細胞である Sf 9、Sf 21 [バキュロウイルス・エクスプレッション・ベクターズ、ア・ラボラトリー・マニュアル、ダブリュー・エイチ・フリーマン・アンド・カンパニー (W. H. Freeman and Company)、ニューヨーク (New York)、(1992)]、*Trichoplusia ni* の卵巣細胞である Hi Five (インビトロジェン社製) 等を用いることができる。

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への組換え遺伝子導入ベクターと

上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法又はリポフェクション法等を挙げることができる。

#### 【0042】

上記の形質転換体は、導入されたDNA構築物の発現を可能にする条件下で適切な栄養培地中で培養する。形質転換体の培養物から、本発明の酵素を単離精製するには、通常の蛋白質の単離、精製法を用いればよい。

例えば、本発明の酵素が、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し水系緩衝液に懸濁後、超音波破碎機等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られた上清から、通常の蛋白質の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル(DEAE)セファロース等のレジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF(ファルマシア社製)等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。

以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

#### 【0043】

##### 【実施例】

本発明の具体例に用いた試薬、試料類は以下の通りである。Fetuin、asialofetuin、bovine submaxillary mucin (BSM)、 $\alpha$ 1-acid glycoprotein、ovomucoid、lactosyl ceramide (LacCer)、GM3、GM1a、GD1a、GD1b、GT1b、CMP-NeuAc、6'-sialyllactose、3'-sialyl-N-acetyllactosamine、及びTriton CF-54はSigma社から購入した。3'-sialyllactose、及び6'-sialyl-N-acetyllactosamineはCalbiochem社から購入した。N-アセチルノイラミン酸(NeuAc)、GM4、Gal、N-アセチルガラクトサミン(GalNAc)は和光純薬から購入した。GD3は雪印乳業から購入した。GQ1bはAlexis Biochemicals社から購入した。CMP- $[^{14}\text{C}]$ -NeuAc (12.0 GBq

/mmol)はAmersham Pharmacia Biotech社から購入した。シアリダーゼ(NANase II, III)はGlyko Inc社から購入した。N-glycanase (Glycopeptidase F)は宝酒造から購入した。 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  dCTPはNEN社から購入した。GM1b, およびその positional analogであるGSC-68, 2,3-sialylparagloboside (2,3-SPG), 2,6-sialylparagloboside (2,6-SPG)は木曾真教授(岐阜大学農学部)から、NeuAc $\alpha$ 2,3Gal, NeuAc $\alpha$ 2,6Galは石田秀樹博士(野口研究所)から寄贈されたものを使用した。抗GD3モノクローナル抗体KM641は協和発酵、設楽研也、花井陳雄両博士から寄贈されたものを使用した。Peroxidase-conjugated AffiniPure goat anti-mouse IgG+IgM(H+L)はJackson Immno. Research社から購入した。BSM,  $\alpha$ 1-acid glycoprotein, ovomucoidの脱シアル化(アシアロ)糖タンパク質は、これらを0.02N HCl中80度、1時間で処理することにより調製した。

#### 【0044】

マウスシアル酸転移酵素ST8Sia Vのアミノ酸配列を用いて、これと相同性を示す新規シアル酸転移酵素をコードしているクローンをNational Center for Biotechnology Informationのexpressed sequence tag (dbEST)のデータベースで検索したところ、GenBank<sup>TM</sup> accession Nos. BE633149, BE686184, BF730564の各クローンが得られた。これらの塩基配列情報をもとに2種類の合成DNA, 5'-CTTTTCTGGAGAACTAAAGG-3' (図1の塩基番号1001-1020に相当)(配列番号3), 5'-AATTGCAAGTTTGAGGATTCC-3' (図1の塩基番号1232-1251の相補鎖に相当)(配列番号4)を作製し、Israelの方法に従い(Israel, D. I. (1993) Nucleic Acids Res. 21, 2627-2631)、ポリメラーゼ連鎖反応法(PCR)を利用してマウス脳および心臓の各cDNAライブラリーをスクリーニングしたところ、新規シアル酸転移酵素の一部をコードしているクローンがそれぞれのcDNAライブラリーから1個ずつ得られた。全長クローンを得るため、さらに2種類の合成DNA, 5'-TGGCTCAGGATGAGATCGGG-3' (図1の塩基番号68-87に相当)(配列番号5), 5'-TACTAGCGCTCCCTGTGATTGG-3' (図1の塩基番号725-746の相補鎖に相当)(配列番号6)を作製し、マウス腎臓由来cDNAを鋳型としてPCR法により両合成DNA間部分のDNAを増幅した。この増幅断片とマウス脳cDNAライブラリーから得られたクローンを連結することにより、全長クローンを得た。このcDNAは398アミノ酸からなる予測分子量45,399のII型膜タン

パク質をコードする単一の翻訳領域を有していた。またそのアミノ酸配列にはシアル酸転移酵素に保存されているシアリルモチーフが存在していた。本タンパク質は既知マウスシアル酸転移酵素の中ではST8Sia I, Vとそれぞれアミノ酸レベルで42.0%, 38.3%の相同性を示した(図2)。なお以下に示すようにこのタンパク質は $\alpha$ 2,8-シアル酸転移酵素活性を有していたことから、これを本発明のO-glycan  $\alpha$ 2,8-シアル酸転移酵素 ST8Sia VIと命名した。

#### 【0045】

本タンパク質の酵素学的諸性質を調べるため、分泌型タンパク質の製造を行った。それぞれXhoIサイトを含む2種類の合成DNA, 5'-TGCTCTCGAGCCCAGCCGACGCGCC TGCCC-3' (図1の塩基番号141-170に相当) (配列番号7), 5'-TATTCTCGAGCTAAGA AACGTTAAGCCGTT-3' (図1の塩基番号1263-1293の相補鎖に相当) (配列番号8) を用い、クローニングした全長cDNAを鋳型としてPCR法により、ST8Sia VIの活性ドメインをコードするDNA断片を増幅した。これをXhoIで切断後、哺乳動物発現ベクターpcDSAのXhoIサイトに挿入した。この発現ベクターをpcDSA-ST8Sia VIと命名した。これはマウス免疫グロブリンIgMのシグナルペプチドとStaphylococcus aureus protein A, およびST8Sia VIの活性ドメインの分泌型融合タンパク質をコードする。pcDSA-ST8Sia VIとリポフェクトアミン(Invitrogen)を用いてCOS-7細胞でその一過性発現を行った(Kojima, N. et al. (1995) FEBS Lett. 360, 1-4)。ここでpcDSA-ST8Sia VIを導入した細胞から細胞外に分泌された本発明のタンパク質をPA-ST8Sia VIと命名した。PA-ST8Sia VIはIgG-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech社)に吸着させて培地より回収した。

#### 【0046】

シアル酸転移酵素活性はLeeらの方法に準じて以下のように行った(Lee, Y.-C. et al. (1999) J. Biol. Chem. 274, 11958-11967)。50 mM MESバッファー(pH 6.0), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5% Triton CF-54, 100  $\mu$ M CMP-[<sup>14</sup>C]-NeuAc, 受容体糖鎖(糖脂質の場合は0.5 mg/ml, 糖タンパク質、オリゴ糖は1 mg/ml)になるように添加), およびPA-ST8Sia VI懸濁液を含む反応液(10  $\mu$ l)を37度で3-20時間インキュベートし、その後、糖脂質についてはC-18カラム(Sep-Pak Vac 100 mg; Waters社)を用いて精製したものを試料として、オリゴ糖、糖タンパク質

については反応産物をそのまま試料として解析を行った。オリゴ糖、糖脂質はシリカゲル60HPTLCプレート(Merck社)にスポットし、エタノール：ピリジン：n-ブタノール：水：酢酸=100:10:10:30:3の展開溶媒（オリゴ糖用）またはクロロホルム：メタノール：0.02%  $\text{CaCl}_2$ =55:45:10の展開溶媒（糖脂質用）で展開した。糖タンパク質の場合はSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって解析を行った。これらの放射活性をBAS2000ラジオイメージアナライザー（フジフィルム）で可視化し、定量した。

表1にPA-ST8Sia VIの基質特異性を示す。

【0047】

【表1】

表1 ST8Sia VIの受容体基質特異性  
PA-ST8Sia VIを用いて様々な受容体基質に対する特異性を検討した。各基質の濃度は、糖脂質の場合は0.5 mg/mlに、糖タンパク質、単糖、オリゴ糖の場合は1 mg/mlになるようにした。相対活性はFetuinの取り込み量(2.06 pmol/h/(ml 酵素液))を100として計算した。RはN型糖鎖の残りの糖鎖部分を意味する。

受容体基質	代表的な構造	相対活性 (%)
糖タンパク質		
Fetuin	NeuAc $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,3GalNAc-O-Ser/Thr NeuAc $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,3(NeuAc $\alpha$ 2,6)GalNAc-O-Ser/Thr NeuAc $\alpha$ 2,6(3)Gal $\beta$ 1,4GlcNAc-R	100 0 0 0 375
Asialofetuin	NeuAc $\alpha$ 2,6(3)Gal $\beta$ 1,4GlcNAc-R	0
$\alpha$ 1-Acid glycoprotein	NeuAc $\alpha$ 2,6GalNAc-O-Ser/Thr	6.2
Asialo- $\alpha$ 1-Acid glycoprotein	GlcNAc $\beta$ 1,3(NeuAc $\alpha$ 2,6)GalNAc-O-Ser/Thr	0
BSM	NeuAc $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,4GlcNAc-R	0
Asialo-BSM		
Ovomucoid		
Asialoomucoid		
糖脂質		
Lactosylceramide	Gal $\beta$ 1,4Glc $\beta$ 1-Cer	0
GM4	NeuAc $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1-Cer	1.0
GM3	NeuAc $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,4Glc $\beta$ 1-Cer	13.0
GM1a	Gal $\beta$ 1,3GalNAc $\beta$ 1,4(NeuAc $\alpha$ 2,3)Gal $\beta$ 1,4Glc $\beta$ 1-Cer	0
GD1a	NeuAc $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,3GalNAc $\beta$ 1,4(NeuAc $\alpha$ 2,3)Gal $\beta$ 1,4Glc $\beta$ 1-Cer	6.0
GD3	NeuAc $\alpha$ 2,8NeuAc $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,4Glc $\beta$ 1-Cer	0
GD1b	Gal $\beta$ 1,3GalNAc $\beta$ 1,4(NeuAc $\alpha$ 2,8NeuAc $\alpha$ 2,3)Gal $\beta$ 1,4Glc $\beta$ 1-Cer	1.1
GT1b	NeuAc $\alpha$ 2,8Gal $\beta$ 1,3GalNAc $\beta$ 1,4(NeuAc $\alpha$ 2,8NeuAc $\alpha$ 2,3)Gal $\beta$ 1,4Glc $\beta$ 1-Cer	0
GQ1b	NeuAc $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,3GalNAc $\beta$ 1,4Gal $\beta$ 1,4Glc $\beta$ 1-Cer	1.0
GM1b	NeuAc $\alpha$ 2,6Gal $\beta$ 1,3GalNAc $\beta$ 1,4Gal $\beta$ 1,4Glc $\beta$ 1-Cer	2.6
GSC-68	NeuAc $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc $\beta$ 1-Cer	3.5
2,3-SPG	NeuAc $\alpha$ 2,6Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc $\beta$ 1-Cer	0.98
2,6-SPG	NeuAc $\alpha$ 2,6Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc $\beta$ 1-Cer	
単糖およびオリゴ糖		
3'-Sialyllactose	NeuAc $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,4Glc	629
6'-Sialyllactose	NeuAc $\alpha$ 2,6Gal $\beta$ 1,4Glc	91.5
3'-Sialyl-N-acetyllactosamine	NeuAc $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,4GlcNAc	411
6'-Sialyl-N-acetyllactosamine	NeuAc $\alpha$ 2,6Gal $\beta$ 1,4GlcNAc	88.7
3'-Sialylgalactose	NeuAc $\alpha$ 2,3Gal	13.9
6'-Sialylgalactose	NeuAc $\alpha$ 2,6Gal	2.0
N-Acetylneuraminic acid	NeuAc	0
Galactose	Gal	0
N-Acetylgalactosamine	GalNAc	0

【0048】

PA-ST8Sia VIはGM4, GM3, GD1a, GT1b, GM1b, GSC-68, 2,3-SPG, 2,6-SPGなど、非還元末端にNeuAc $\alpha$ 2,3(6)Gal-という構造をもつ糖脂質に対して活性を示した。このうちGM3を基質とした場合、その反応産物は $\alpha$ 2,3-,  $\alpha$ 2,6-結合で結合しているシアル酸を特異的に切断するシアリダーゼ(NANase II)では導入シアル

酸が切断されなかったが、 $\alpha 2,3-$ 、 $\alpha 2,6-$ 、 $\alpha 2,8-$ 、 $\alpha 2,9-$ 結合で結合しているシアル酸を特異的に切断するシアリダーゼ (NANase III) では、導入シアル酸が切断された (図3A)。またこの反応産物は抗GD3モノクローナル抗体KM641を用いたTL C免疫染色 (Saito, M. et al. (2000) Biochim. Biophys. Acta 1523, 230-235) によって $\alpha 2,8$ 結合を介してシアル酸が導入されたGD3であることが確認されたことから (図3B)、PA-ST8Sia VIはシアル酸を $\alpha 2,8-$ の結合様式で転移することが明らかになった。

#### 【0049】

一方、糖タンパク質を基質とした場合 (表1)、PA-ST8Sia VIはO型糖鎖のみを含有するBSMに対して最も高い活性を示した。O型糖鎖、N型糖鎖を含有するFetuin、N型糖鎖のみを含有するOvomucoidに対しても活性を示したが、Ovomucoidに対する活性はO型糖鎖を含むタンパク質に比べると低かった。なお、PA-ST8Sia VIはアシアロ糖タンパク質に対しては全く活性を示さなかった。また単糖およびオリゴ糖を基質とした実験により (表1)、PA-ST8Sia VIが基質として認識する最小糖鎖単位はNeuAc  $\alpha 2,3(6)$ Galであることが明らかになった。

#### 【0050】

Fetuinを基質としたとき、PA-ST8Sia VIによってあらたに導入されたシアル酸の大部分はO型糖鎖に取り込まれていることがN-glycanase処理によって明らかになった (図4)。すなわちPA-ST8Sia VIを用いてFetuinを $[^{14}\text{C}]$ -NeuAcでシアル化し、これをN型糖鎖をペプチド部分から遊離するN-glycanaseで処理すると、大部分 (82.7%) の放射活性はこのFetuinに保持されたままであった。このことはPA-ST8Sia VIによって導入されたシアル酸の大部分はO型糖鎖に取り込まれたことを示す。一方、N型糖鎖を基質とするST8Sia IIIを用いて同様の実験を行ったところ、放射活性は完全に消失した。

#### 【0051】

さらにPA-ST8Sia VIの基質特異性および選択性を明らかにするため、BSMとGM3に対するKm値、Vmax値を求めた。BSMに対してはKm値=0.03 mM, Vmax値=23.8 pmol/h/(ml酵素液)で、Vmax/Km値は793であった。一方、GM3に対してはKm値=0.5 mM, Vmax値=0.67pmol/h/(ml酵素液)で、Vmax/Km値は1.34であった。以上の結果は



、PA-ST8Sia VIにとってO型糖鎖が糖脂質やN型糖鎖よりはるかに好ましい基質であることを示しており、このことはST8Sia VIが従来の $\alpha 2,8$ -シアル酸転移酵素とは異なる基質特異性を有することを意味する。

【 0 0 5 2 】

【発明の効果】

本発明により新規酵素としてO-glycan  $\alpha 2,8$ -シアル酸転移酵素、および該酵素の活性部分を有し細胞外に分泌される新規蛋白質が提供される。本発明の酵素および蛋白質は、O-glycan  $\alpha 2,8$ -シアル酸転移酵素活性を有するので、例えば、蛋白にヒト型の糖鎖を導入する試薬として有用である。また、本発明のO-glycan  $\alpha 2,8$ -シアル酸転移酵素は、ヒトに特異的な糖鎖を欠く遺伝性疾患の治療のための医薬として有用である。さらに、本発明のO-glycan  $\alpha 2,8$ -シアル酸転移酵素は、癌転移抑制、ウイルス感染防止、炎症反応抑制、神経組織賦活作用を目的とする医薬としても用いることが可能である。さらにまた、本発明のO-glycan  $\alpha 2,8$ -シアル酸転移酵素は、薬剤等にシアル酸を付加することにより生理作用を増加させるための研究用試薬などとして有用である。

【 0 0 5 3 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> RIKEN

<120> Sugar chain synthetase

<130> A21046A

<160> 8

【 0 0 5 4 】

<210> 1

<211> 398

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 1

Met Arg Ser Gly Gly Thr Leu Phe Ala Leu Ile Gly Ser Leu Met Leu

1	5	10	15
Leu Leu Leu	Leu Arg Met	Leu Trp Cys	Pro Ala Asp
20	25	30	
Ser Arg Leu	Leu Met Glu	Gly Ser Arg	Glu Asp Thr
35	40	45	
Ala Ala Leu	Lys Thr Leu	Trp Ser Pro	Thr Thr Pro
50	55	60	
Arg Asn Ser	Thr Tyr Leu	Asp Glu Lys	Thr Thr Gln
65	70	75	80
Cys Lys Asp	Leu Gln Tyr	Ser Leu Asn	Ser Leu Ser
85	90	95	
Arg Tyr Ser	Glu Asp Asp	Tyr Leu Gln	Thr Ile Thr
100	105	110	
Cys Pro Trp	Asn Arg Gln	Ala Glu Glu	Tyr Asp Asn
115	120	125	
Leu Ala Ser	Cys Cys Asp	Ala Ile Gln	Asp Phe Val
130	135	140	
Asn Thr Pro	Val Gly Thr	Asn Met Ser	Tyr Glu Val
145	150	155	160
His Ile Pro	Ile Arg Glu	Asn Ile Phe	His Met Phe
165	170	175	
Pro Phe Val	Asp Tyr Pro	Tyr Asn Gln	Cys Ala Val
180	185	190	
Gly Ile Leu	Asn Lys Ser	Leu Cys Gly	Ala Glu Ile
195	200	205	
Phe Val Phe	Arg Cys Asn	Leu Pro Pro	Ile Thr Gly
210	215	220	
Asp Val Gly	Ser Lys Thr	Asn Leu Val	Thr Val Asn
225	230	235	240

Thr Leu Lys Tyr Gln Asn Leu Lys Glu Lys Lys Ala Gln Phe Leu Glu

245

250

255

Asp Ile Ser Thr Tyr Gly Asp Ala Phe Leu Leu Leu Pro Ala Phe Ser

260

265

270

Tyr Arg Ala Asn Thr Gly Ile Ser Phe Lys Val Tyr Gln Thr Leu Lys

275

280

285

Glu Ser Lys Met Arg Gln Lys Val Leu Phe Phe His Pro Arg Tyr Leu

290

295

300

Arg His Leu Ala Leu Phe Trp Arg Thr Lys Gly Val Thr Ala Tyr Arg

305

310

315

320

Leu Ser Thr Gly Leu Met Ile Ala Ser Val Ala Val Glu Leu Cys Glu

325

330

335

Asn Val Lys Leu Tyr Gly Phe Trp Pro Phe Ser Lys Thr Ile Glu Asp

340

345

350

Thr Pro Leu Ser His His Tyr Tyr Asp Asn Met Leu Pro Lys His Gly

355

360

365

Phe His Gln Met Pro Lys Glu Tyr Ser Gln Met Leu Gln Leu His Met

370

375

380

Arg Gly Ile Leu Lys Leu Gln Phe Ser Lys Cys Glu Thr Ala

385

390

395

【0055】

<210> 2

<211> 3166

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 2

cggagcggcg agtcggtgcc gcccggtctg cgcttcgcc cggcagcttt ggccggcgagg 60

acgcccgtgg ctcagg atg aga tcg ggg ggc acg ctg ttc gcc ctc ata 109

Met Arg Ser Gly Gly Thr Leu Phe Ala Leu Ile

1	5	10	
ggc agc ctg atg ctg ctg ctc ctc ctg cgt atg ctc tgg tgc cca gcc	157		
Gly Ser Leu Met Leu Leu Leu Leu Leu Arg Met Leu Trp Cys Pro Ala			
15	20	25	
gac gcg cct gcc cgc tcc agg ctg ttg atg gag gga agc aga gag gac	205		
Asp Ala Pro Ala Arg Ser Arg Leu Leu Met Glu Gly Ser Arg Glu Asp			
30	35	40	
acc agt ggt acc tca gct gca ctg aag aca ctc tgg agc ccg aca acc	253		
Thr Ser Gly Thr Ser Ala Ala Leu Lys Thr Leu Trp Ser Pro Thr Thr			
45	50	55	
ccg gta cca cgc acc agg aac agc aca tat ctg gat gag aag aca acc	301		
Pro Val Pro Arg Thr Arg Asn Ser Thr Tyr Leu Asp Glu Lys Thr Thr			
60	65	70	75
caa ata aca gag aaa tgc aaa gat ctg caa tat agc ttg aac tct tta	349		
Gln Ile Thr Glu Lys Cys Lys Asp Leu Gln Tyr Ser Leu Asn Ser Leu			
80	85	90	
tct aac aaa acg aga cgg tac tct gag gat gac tac ctc cag acc atc	397		
Ser Asn Lys Thr Arg Arg Tyr Ser Glu Asp Asp Tyr Leu Gln Thr Ile			
95	100	105	
aca aac ata cag aga tgc cca tgg aac cgg caa gca gaa gaa tat gac	445		
Thr Asn Ile Gln Arg Cys Pro Trp Asn Arg Gln Ala Glu Glu Tyr Asp			
110	115	120	
aat ttt aga gca aaa ctg gct tcc tgt tgc gat gcc att caa gac ttc	493		
Asn Phe Arg Ala Lys Leu Ala Ser Cys Cys Asp Ala Ile Gln Asp Phe			
125	130	135	
gtg gtt tcc cag aac aac act cca gtg ggg act aac atg agc tac gag	541		
Val Val Ser Gln Asn Asn Thr Pro Val Gly Thr Asn Met Ser Tyr Glu			
140	145	150	155
gtg gaa agc aag aaa cac atc ccc att cga gag aac att ttc cac atg	589		

Val Glu Ser Lys Lys His Ile Pro Ile Arg Glu Asn Ile Phe His Met	
160 165 170	
ttt cca gtg tgc cag cct ttt gtg gac tat ccc tat aac cag tgt gca	637
Phe Pro Val Ser Gln Pro Phe Val Asp Tyr Pro Tyr Asn Gln Cys Ala	
175 180 185	
gtg gtt ggt aat ggg gga att ctc aac aag tct ctc tgc gga gca gaa	685
Val Val Gly Asn Gly Gly Ile Leu Asn Lys Ser Leu Cys Gly Ala Glu	
190 195 200	
att gat aaa tct gac ttc gtc ttc agg tgt aac ctc ccc cca atc aca	733
Ile Asp Lys Ser Asp Phe Val Phe Arg Cys Asn Leu Pro Pro Ile Thr	
205 210 215	
ggg agc gct agt aaa gat gtt gga agc aaa aca aat ctt gtg act gtc	781
Gly Ser Ala Ser Lys Asp Val Gly Ser Lys Thr Asn Leu Val Thr Val	
220 225 230 235	
aat ccc agc att ata acc ctg aag tac cag aat ttg aag gag aag aaa	829
Asn Pro Ser Ile Ile Thr Leu Lys Tyr Gln Asn Leu Lys Glu Lys Lys	
240 245 250	
gca cag ttt ttg gag gac atc tcc acc tat gga gat gca ttc ctc ctc	877
Ala Gln Phe Leu Glu Asp Ile Ser Thr Tyr Gly Asp Ala Phe Leu Leu	
255 260 265	
ctg cca gca ttt tcc tat cgg gcc aac aca ggc atc tct ttt aaa gtc	925
Leu Pro Ala Phe Ser Tyr Arg Ala Asn Thr Gly Ile Ser Phe Lys Val	
270 275 280	
tac caa aca ctc aaa gag tca aaa atg agg caa aag gtt ctc ttc ttc	973
Tyr Gln Thr Leu Lys Glu Ser Lys Met Arg Gln Lys Val Leu Phe Phe	
285 290 295	
cat ccc agg tac ctg aga cac ctc gct ctt ttc tgg aga act aaa ggg	1021
His Pro Arg Tyr Leu Arg His Leu Ala Leu Phe Trp Arg Thr Lys Gly	
300 305 310 315	

gtg act gca tac cgc ttg tcc aca ggc ttg atg att gca agt gtc gct 1069  
 Val Thr Ala Tyr Arg Leu Ser Thr Gly Leu Met Ile Ala Ser Val Ala  
 320 325 330  
 gtg gaa ctg tgt gaa aac gtg aag ctc tac gga ttc tgg cct ttc tct 1117  
 Val Glu Leu Cys Glu Asn Val Lys Leu Tyr Gly Phe Trp Pro Phe Ser  
 335 340 345  
 aag act atc gaa gac acc cca ctc agt cac cac tac tat gat aac atg 1165  
 Lys Thr Ile Glu Asp Thr Pro Leu Ser His His Tyr Tyr Asp Asn Met  
 350 355 360  
 tta cct aag cat ggt ttc cac cag atg cct aaa gaa tac agc caa atg 1213  
 Leu Pro Lys His Gly Phe His Gln Met Pro Lys Glu Tyr Ser Gln Met  
 365 370 375  
 ctc cag ctc cat atg aga gga atc ctc aaa ctg caa ttc agc aaa tgt 1261  
 Leu Gln Leu His Met Arg Gly Ile Leu Lys Leu Gln Phe Ser Lys Cys  
 370 385 390 395  
 gaa acg gct taa cggttct tagaaggaga ataatttcag gaggtggagt 1310  
 Glu Thr Ala  
 398  
 ggatgtgtca cagcatctcc aaaaagccaa tagaagaagg cacagagaaa gcatgaatta 1370  
 caaaggcgct ctccacttg tctagaccaa agccaccgc cccactcac tttgcagcct 1430  
 ccacgagtca ctattctca ccttcaacgt tctttctctg agaatagaga ccaaaacatc 1490  
 agacttgat aagtaaaatg agataatttt tcaaatcatc atagaatttg atttgagcca 1550  
 gggctcttca gaatgcttcc ttgttctat ccatgatagc cattcccacc tttatcagag 1610  
 tggtaatgaa actgtgcaat tgtgcaaag accctttctg aagagaatgt ctgaatcatg 1670  
 cgccgagttt ttacacacag ctcttcttt ataaataaat ccttcccatt ctccctccta 1730  
 gtagagtaca gaaacaaaat acccttgatg attcaggaag aaaagtcttt tttacttagc 1790  
 aatgtgcctg ctcttgattc agttcgcttg tgacattaag ctgggttggg gttttggttg 1850  
 gatttggggc gtttcttcac ttcttttgc tatatttcc ttacctttat cagtttgtat 1910  
 tcgagcttcc tgctttggga ttctgcaatt ctctctccca ctgacaggat caactcaatg 1970

acataaagta gttcaaacat ccattgcttc tcacatgttt tatccataaa gttactcatc 2030  
 tgattttatt taaaatagtg aacatctact tgatatacaga cccgaggacc atcctccatt 2090  
 ggagaatatg aagatattgt cactggcaga aaagcaggtg tgtgccatta attgataaga 2150  
 taccacaagc atcatcatgc cagttatgaa cacagtgtg aaaggatcat agacaggggt 2210  
 ggttaaatct gatcccagta gaataaactt cagtgtacct atttcaggga agagttaatt 2270  
 tcacaattaa aactagtaaa tgaaccaatt cttaggcaca ttaagtggat tctgagtaaa 2330  
 agaaaggga cagcaggaga aagctgttcg cttggttctg attacccaaa tgagcatgct 2390  
 ggaaggaggt tgtgaggcta cgctaaaacc tctgcgtagg gagagagtac agtgcattgag 2450  
 tgtggcggct tttgtccaca ctcgtgaagg gtgagtaatt cagagccaat cacatcacia 2510  
 ggatggacac acctaaacta tcacttcagg gggagatgaa tgctttcatg agaaattaca 2570  
 ctcataagct aagcatcagt tttgagtaaa atttgagtag atgttaaata tgaacatttt 2630  
 atacctctta ctaatgtccc accgacacct tttaatgtaa gcacatttat ttattaagtt 2690  
 acttgacatt aaatgcttat gtctgtatat tctgttcac catcgatttt cccaaaaagt 2750  
 aagagcatag gagatgaggc ctacatgcca agaaaactat aaattttact ctttaattct 2810  
 tacttgagcc agcttgttgt ttatcaagtg cttttttgaa gagacagcac cctgtgaatt 2870  
 cttcattctg atacagtgtc accttgatt taacatttgt aatgttggtt caagtttaca 2930  
 tctctttcat tcttttatag caaatcaaac gtattagctt cagaaattta tcagaagttc 2990  
 atatataaat attttgcaaa gggtaaaagg cttttttgtt aaataaaata aaatttatta 3050  
 ttttctctg atgaatagag gctcttttat gctgctgcta atgaacctaa ttagctttta 3110  
 attatctcct agcaacattg gtcacgttc aatcatgcta ttagcaaaaa aaaaaa 3166

【0056】

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 3

cttttctgga gaactaaagg

20

## 【0057】

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 4

aattgcagtt tgaggattcc 20

## 【0058】

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 5

tggtcagga tgagatcggg 20

## 【0059】

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 6

tactagcgct ccctgtgatt gg 22

## 【0060】

&lt;210&gt; 7



<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 7

tgctctcgag cccagccgac ggcctgccc 30

【 0 0 6 1 】

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 8

tattctcgag ctaagaaacg ttaagccgtt 30

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 は、ST8Sia VI cDNA の塩基配列と予測アミノ酸配列を示す。膜貫通ドメインは下線、シアリルモチーフ L は二重線、シアリルモチーフ S は破線で示してある。シアリルモチーフ VS で保存されているヒスチジンとグルタミン酸は四角で囲ってある。N 型糖鎖が結合すると予想されるアスパラギンには上線を付してある。

【図 2】

図 2 は、マウスシアル酸転移酵素 ST8Sia I, ST8Sia V, ST8Sia VI のアミノ酸配列の比較を示す。各シアル酸転移酵素間で保存されているアミノ酸は四角で囲ってある。シアリルモチーフ L は二重線で、シアリルモチーフ S は破線で示してある。シアリルモチーフ VS で保存されているヒスチジンとグルタミン酸にはアスタリスクを付してある。

【図 3】

図3は、PA-ST8Sia VIによりGM3に導入されたシアル酸の結合様式の解析と、その反応産物のTLC免疫染色を示す。

A. PA-ST8Sia VIによりGM3を $[^{14}\text{C}]$ -NeuAcでシアル化し、それを $\alpha 2,3$ -,  $\alpha 2,6$ -結合特異的なシアリダーゼ(NANase II)、 $\alpha 2,3$ -,  $\alpha 2,6$ -,  $\alpha 2,8$ -,  $\alpha 2,9$ -結合特異的なシアリダーゼ(NANase III)で処理した反応産物をHPTLCで展開した結果を示す。

B. GM3をPA-ST8Sia VIによりシアル化した反応産物のTLC免疫染色の結果を示す。レーン1, GD3 (1  $\mu\text{g}$ ); レーン2, GM3 (1  $\mu\text{g}$ ); レーン3, 反応産物。抗GD3モノクローナル抗体KM641およびPeroxidase-conjugated anti-mouse IgG + IgM (H+L)で反応させた後、ECLで発色した。

#### 【図4】

図4は、ST8Sia IIIまたはST8Sia VIによって $[^{14}\text{C}]$ -NeuAcを取り込ませたFetuinをN-glycanaseで処理した結果を示す。

$[^{14}\text{C}]$ -NeuAcを取り込ませたFetuinをN-glycanaseで処理し、SDS-PAGEで解析後、BAS2000ラジオイメージアナライザーで可視化した。

図面

【図 1】

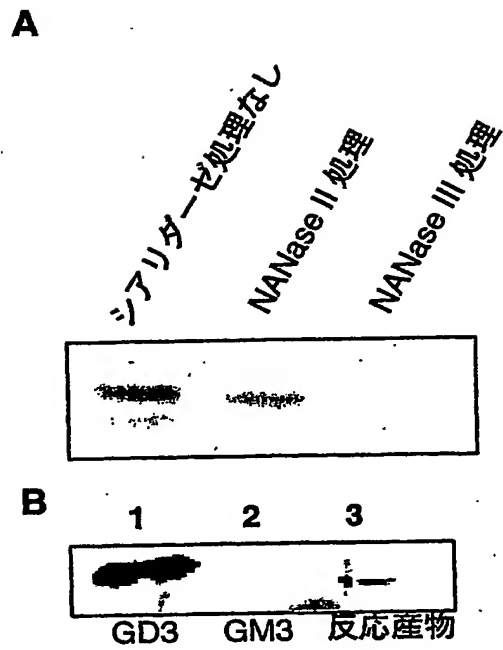
[illegible]

【图 2】

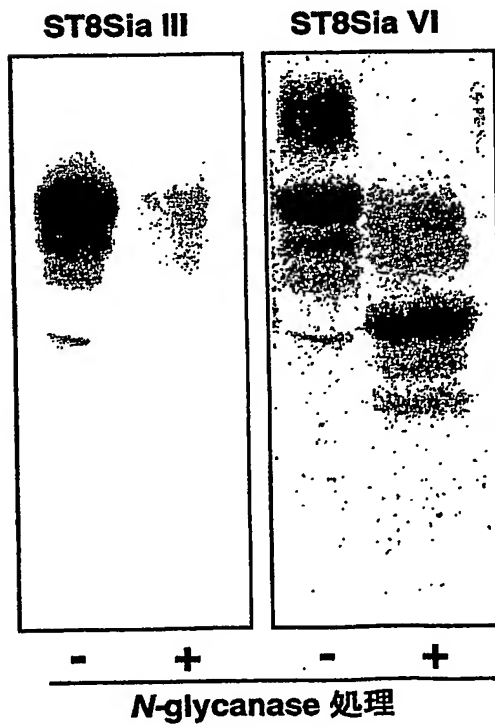
ST8Sia I	1	M--S--ECG--RAHTSR-----G--AM--AM--AR-----K--F--PR--T--RL--PVG---A---	31
ST8Sia V	1	MRYADESANEDLGNRTLLRIFHCAPAVTLQQILYSKSYIKH--GFQFGWQRGDQQANW	59
ST8Sia VI	1	-----MRSGGJ--LEAILGSLMLLLLRMLWCPADAPASRLLMEGSHETTSGETS	48
ST8Sia I	32	SAI-----C-V---VV---LCWLY-IF--HV-Y---H--IPNEKEIVQG-VIA---QRT--A	66
ST8Sia V	60	TGIFNDSDSPTEQNI TGSSQRYFEFYKHEE LEFNSTHCHIELRQCEIL EVKVI SMVKQ SEHFE	119
ST8Sia VI	49	AAI--KTLWSPJTPVPRTRNS TYLD--ERTTQITEKCKDLQYSLNSLSNKT RRRYSEDDYL--Q	105
ST8Sia I	67	-MRT-N--Q-----TG--ASLFRQMEDCCIPAHIEAMTKMNSHCKSKSLWYDGHLLYSFTII	117
ST8Sia V	120	RMKSLQICKWAMGASEASLHKSTISRCQNPFLFTCKNTPTVETNIRYEVES SGLYHII	179
ST8Sia VI	106	TITNIGRCFWRNQAEHYDNFRAKIASCCDAIQDEVVSONNTPVGTNMSYEVESKKHIFIR	165
ST8Sia I	118	NSTYSILFFHQATE--FQLELKKCAVVNGGGILXMSGQARQIIEFPFVMRCNLPPLSSEYTRR	176
ST8Sia V	180	QEIHKMFHEKEMHYRSQFKKCAVVNGGGILXNSGCGKEINSADEFVRCNLPPIISCIYTTD	239
ST8Sia VI	166	ENIEHMFHVSOHFVDYHYNQCAVVNGGGILXNKLCCGAELIKSDVFRCNLPPIITGSASND	225
ST8Sia I	177	VGSKTQLVTANPSIIRQRENI--LMSKKFVDNMKILNHSYIYMPAFS MKTGTETEPILRVY	235
ST8Sia V	240	VGKTDVVTVNPSIIRIDREHKLEKM--HRRFFSVLQRYENASVLLPAFYNNVRNTLVSFRAK	298
ST8Sia VI	226	VGSKTNLVTVNPSIITLKYQNIKE--KKAQFLEDISTYGDHFI LLPAF SYRANTGISSEKIVY	284
ST8Sia I	236	YTLKIVGANC TVLEANEFLNIGKFWKRG IHA KRLSTGIFLVSAALGLCEEVSIYGFW	295
ST8Sia V	299	YMLIDFQSRCPVYFFHHQYISVSRYWLSLGVRA RFI STGISLVTAALELCEEVHIFGFW	358
ST8Sia VI	285	QTLHESKMRCQKVLFFHFRYLRHLALEFWRTKGVTA YRLSTGIMI ASVAVELCHNKL YGFW	344
ST8Sia I	296	PFSVNMQGDPI SHHYDNDVLEHFSQYHAMHEEFILWYLLH KIGALRMQLDPCHEPSPQPTS	355
ST8Sia V	359	APPMNPSCFFITHHYYDNNKPKPGFHAMHSEIFTFLRMHSGRGIH VHTGTQ--NCC-----	412
ST8Sia VI	345	PFSKTIEDTHLSHHYYDNNMLPKHGFHQMFKHYSQMLQLHMRGIILKLF SKCHTA-----	398

\* \*

【図 3】



【図 4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 O型糖鎖に対し高い活性を示す新規なO-glycan  $\alpha$ 2,8-シアル酸転移酵素を提供すること。

【解決手段】 以下の基質特異性および基質選択性を有することを特徴とする、O-glycan  $\alpha$ 2,8-シアル酸転移酵素。

基質特異性：末端にSia $\alpha$ 2,3(6)Gal（ここで、Siaはシアル酸を示し、Galはガラクトースを示す）構造をもつ糖を基質とする；

基質選択性：糖脂質およびN型糖鎖よりも優先的にO型糖鎖に対してシアル酸を取り込ませる；

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000006792]

1. 変更年月日	1990年 8月28日
[変更理由]	新規登録
住 所	埼玉県和光市広沢2番1号
氏 名	理化学研究所

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**